

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24620001

研究課題名(和文)植物の宇宙放射線耐性メカニズムとゲノム不安定化に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms of resistance to cosmic radiation and genomic instability of plant

研究代表者

寺西 美佳 (Teranishi, Mika)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：10333832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：エックス線、ガンマ線、UV-Bを、線量を変えてシロイヌナズナに照射し、誘発されたDNA損傷数を、DNA二本鎖切断(DSB)、一本鎖切断(SSB)、シクロブタン型ピリミジン二量体(CPD)に分けて定量した。この結果より、いずれの放射線でもDSB、SSB、CPDの3種のDNA損傷も誘発されるが、誘発される頻度は放射線の種類により異なることが示された。本研究において相同組換えマーカーを導入したゼニゴケ系統を得ることができた。DSB誘発試験存在下にて培養したところ、相同組換えスポットが観察された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we measured the number of DNA damages induced by ionizing radiation (gamma ray and x-ray) and non-ionizing radiation (UV-B radiation) in Arabidopsis seedlings. After irradiation, whole plants used for preparing an agarose plug. The agarose plugs were subjected to denature and non-denature agarose gel electrophoresis. The number of DNA double strand break (DSB), single strand break (SSB) and cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) were calculated using the molecular length standard curve and the quantity of DNA at each migration position as shown by the quantitative image data. As a result, the number of DNA damages increased with increasing dose of radiation. DSB, SSB and CPD were induced by irradiation with gamma ray, x-ray and UV-B radiation. However, induction efficiency was different among the types of radiation. Furthermore, we constructed the transgenic Marchantia polymorpha which has marker gene as a recombination substrate for detect a homologous recombination.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 植物 DNA 損傷 ゲノム不安定化

1. 研究開始当初の背景

植物は、一次生産者として食物連鎖の基底をなすのみならず、育て眺めることで人の心を癒すため、人生の質(quality of life: QOL)の向上にも有用である。近年、宇宙長期滞在を目指したプロジェクトとして、宇宙空間において植物を栽培することが求められている。植物は、長期の有人宇宙活動を支える食料として必須であり、二酸化炭素の酸素への変換にも機能することから、閉鎖生態系生命維持システム(controlled ecological life support system: CELSS)の主軸であり、さらに宇宙飛行士の QOL 向上にも有効である。また、宇宙において農業を行う宇宙農業構想が JAXA(宇宙航空研究開発機構)を中心として提言されている。

しかしながら宇宙空間には、地上と異なる様々なストレス(宇宙放射線、微小重力、低圧力など)が存在するため、植物栽培は容易ではない。中でも宇宙放射線は、生物の根幹をなす DNA に損傷を誘発し、変異を生み出すことから、生命機能の維持と安定した種の継続の妨げとなるため、大きな問題であるにもかかわらず、放射線が植物に与える影響については十分に解明されていないのが現状である。

2. 研究の目的

そこで本研究は、宇宙環境での栽培が可能な放射線耐性植物を創り出すため、植物の放射線耐性メカニズムを明らかにすることを目的とした。様々な放射線が複合的に照射される宇宙放射線の影響を明らかにするため、(1)放射線の種類によって誘発される DNA 損傷に特異性が見られるか、また(2)放射線照射によってゲノム不安定化が増加するのかを解析した。

3. 研究の方法

(1) 植物への放射線照射

植物への放射線照射には以下の機器、および施設を用いた。エックス線：軟エックス線照射装置 OM-B205(株式会社オーミック)、ガンマ線：コバルト 60 ガンマ線照射施設(国立研究開発法人、量子科学技術研究開発機構、高崎量子応用研究所)、UV-B ランプ：FL20SE(東芝ライテック株式会社)

(2) DNA 損傷の測定

各種放射線を照射後、冷凍保存した植物体を乳鉢に移し、液体窒素を加えながら粉末状に磨砕した。粉末状にした植物サンプルにプロテアーゼ K を含むバッファーを加えて混合した後、融解させた低融点アガロースを等量加えた。混合液を直径 5 mm 程度円形の窪みを持つプラスチック型に流し込み凝固させ、アガロースプラグを作製した。アガロースプラグをプロテアーゼ K を含むバッファーにて処理することで、プラグ中にて DNA を抽出した。洗浄後、プロテアーゼを不活化させ、サ

ンプルとした。

DNA 二本鎖切断(double strand break: DSB)を定量するためには非変性条件下にて電気泳動を行った。また DNA 一本鎖切断(single strand break: SSB)を定量するためにはアルカリ変性条件下にて電気泳動を行った。またシクロブタン型ピリミジン二量体(cyclobutane pyrimidine dimer: CPD)を定量するためには *Micrococcus luteus* の破砕菌体から粗精製した UV endonuclease、もしくは市販の T4 endonuclease V(epicentre社)にて処理することで CPD 生成部位を特異的に切断した後、アルカリ変性条件下にて電気泳動を行った。

泳動後のゲルを染色し、CDD カメラを用いてゲルを撮影した。分子量マーカーの移動度をもとに作成した検量曲線より各サンプルの平均分子量を測定し、DNA 損傷数を算出した(引用文献)。

(3) 形質転換ゼニゴケの作製

プラスミドを導入したアグロバクテリウム(EHA101株)を液体培養した後、無性芽から培養したゼニゴケ葉状体を加え、2日間振とう条件下にて共存培養を行った。滅菌水にて洗浄することでアグロバクテリウムを除いた後、終濃度 30 mg L⁻¹のピアラフォスを含む培地上に葉状体を置き、薬剤耐性を持つ形質転換ゼニゴケを選抜した。

(4) 組換えスポットの検出

ゼニゴケを 1 mM の 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta delta-glucuronic acid(X-GLUC)を含むバッファーに浸し、5分間減圧処理することによりゼニゴケ内にバッファーを浸み込ませた。37℃にて4時間反応させ、X-GLUCの発色を行わせた。その後、70%エタノールにてゼニゴケが持つクロロフィル色素を脱色し、顕微鏡下にて観察を行った(引用文献)。

4. 研究成果

(1) 放射線の種類によって誘発される DNA 損傷に特異性が見られるかを解析するため、エックス線、ガンマ線、または UV-B を、線量を変えてシロイヌナズナに照射した。誘発された DNA 損傷数を、DSB、SSB、CPD に分けて定量した。その結果、いずれの放射線においても照射線量の増加に伴い DSB、SSB、CPD の誘発数が増加することが分かった。生じた DNA 損傷数を、エックス線およびガンマ線に関しては 1,000 Gy、UV-B に関しては 36 kJ m⁻² の強度にて照射した際に DNA 百万塩基(メガベース: Mb)あたりに誘発された DNA 損傷数に換算したところ、DSB、SSB、CPD 損傷の誘発数はそれぞれ、エックス線照射では 3.1、2.2、3.0 個 Mb⁻¹、ガンマ線照射では 1.0、3.0、5.0 個 Mb⁻¹、UV-B 照射では 0.5、4.0、50.0 個 Mb⁻¹であった。これまで解析されてきたカーボンイオンビーム、ヘリウムイオンビーム

にて誘発された DNA 損傷数を同様に換算したところ、1,000 Gy の強度にて照射した場合、DSB、SSB、CPD 損傷はそれぞれ、カーボンイオンビーム照射では 2.0、0.5、1.8 個 Mb⁻¹、ヘリウムイオンビーム照射では 1.4、2.9、2.8 個 Mb⁻¹であった。

これらの結果を DSB の誘発数を 1 とした相対値で比較すると、DSB、SSB、および CPD の中で、それぞれの放射線照射によって最も生じやすい DNA 損傷は、エックス線照射では DSB と CPD が同程度であり、ガンマ線照射では CPD、カーボンイオンビーム照射では DSB、ヘリウムイオンビーム照射では SSB、UV-B 照射では CPD であった (表 1)。この結果より、放射線の種類によって DSB、SSB、CPD のいずれの DNA 損傷も誘発されるが、誘発される頻度は放射線の種類により異なることが示された。

表1 放射線照射により誘発されたDNA損傷数 (DNA二本鎖切断の誘発数を1とした相対値)

	二本鎖切断	一本鎖切断	CPD
エックス線 ¹	1	0.7	1.0
ガンマ線 ¹	1	3.0	5.0
カーボンイオンビーム ¹	1	0.3	0.9
ヘリウムイオンビーム ¹	1	2.1	2.0
UV-B ²	1	8.0	100.0

1: 1,000 Gy照射した際に生じたDNA損傷数

2: 36 kJ m⁻²照射した際に生じたDNA損傷数

また、CPD 損傷は UV-B 照射によって高頻度に誘発されることが知られるが、エックス線照射によっては DSB と同程度に、またガンマ線照射によっては DSB よりも 5 倍多く誘発されることが分かった (表 1)。近年、大腸菌において、ガンマ線照射によって CPD が誘発されることが報告されており (引用文献)、植物においてもガンマ線やエックス線照射によって CPD が生じていると考えられた。

(2) 各種放射線の照射により相同組換え頻度が上昇するのかを解析するため、-glucuronidase (GUS) 遺伝子配列の一部を繰り返した形をとるプラスミドを Dr. H. Puchta (カールスルーエ工科大学、ドイツ) から分譲を受けた (引用文献)。このプラスミドをアグロバクテリウム法によりゼニゴケ野生株 Tak1 に導入し、選抜マーカーであるピアラフォスに耐性を示す系統を選抜することで、相同組換えマーカーを導入したゼニゴケ系統を作製した。

相同組換えマーカーを導入したゼニゴケ選抜系統を、DSB 誘発試薬であるゼオシン存在下に培養したところ、培地中に 50 μM のゼオシンを含む条件下において、葉状体の表面積を指標とした生育度が非処理区と比べて約 50%に阻害された。またその際、一部の個体において植物体あたり 1 箇所の相同組換えにスポットが GUS の発色として観察された (図 1)。そこで、エックス線、または UV-B を照射し、相同組換えが見られるかについて解析を行った。葉状体の表面積の生育度が非処理区と比べて約 50%に阻害される線量の放

射線を照射した場合においては、組換えスポットは検出されなかった。

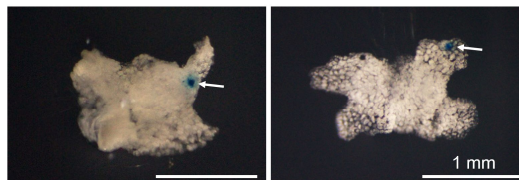


図1 ゼオシン処理により誘発された相同組換えスポット

ゼニゴケは、植物が陸上化した後、最も早くに分岐したとされる基部陸上植物タイ類に属しており、高い放射線耐性を有する可能性が考えられるとともに、遺伝子の冗長性が低いことからモデル生物として有用であると考えられている。本研究において相同組換えマーカーを持つゼニゴケ系統を得ることができた。今後は、エックス線と UV-B の複合処理、また低温や高温などの各種ストレスと組み合わせた処理を行い、組換え頻度が上昇するかを解析することで、複合的なストレスに曝露される宇宙空間において、植物に生じると考えられるゲノム不安定化を明らかにすることができると思われる。

<引用文献>

Hidema J, Kumagai T, Sutherland BM. UV radiation-sensitive Norin 1 rice contains defective cyclobutane pyrimidine dimer photolyase. *The Plant Cell*, 12, 2000, 1569-1578.

Ishizaki K, Chiyoda S, Yamato KT, Kohchi T. Agrobacterium-mediated transformation of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L., an emerging model for plant biology. *Plant and Cell Physiology*, 49, 2008, 1084-1091.

Beauchamp S, Lacroix M. Resistance of the genome of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* to irradiation evaluated by the induction of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts using gamma and UV-C radiations. *Radiation Physics and Chemistry*, 81, 2012, 1193-1197.

Siebert R, Puchta H. Efficient repair of genomic double-Strand breaks by homologous recombination between directly repeated sequences in the plant genome. *The Plant Cell*, 14, 2002, 1121-1131.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Li N, Teranishi M, Yamaguchi H, Matsushita T, Watahiki MK, Tsuge T, Li SS, Hidema J. UV-B-induced CPD photolyase gene expression is regulated by UVR8-dependent and -independent pathways in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 査読有, 56, 2015, 2014-2023.
DOI: 10.1093/pcp/pcv121.

Takahashi S, Teranishi M, Izumi M, Takahashi M, Takahashi F, Hidema J. Transport of cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) photolyase into mitochondria relies on a targeting sequence located in its C-terminal internal region. *The Plant Journal*, 査読有, 79, 2014, 951-963.
DOI: 10.1111/tpj.12598.

Teranishi M, Yamaguchi H, Sakamoto AN, Hidema J. Analysis of DNA strand breaks induced by carbon ion beams in *Arabidopsis*. *JAEA-Review 2014*, 査読有, 1, 2015, 115.

Teranishi M, Nakamura K. The phosphorylation status of CPD photolyase in wild rice and other poaceae species. *Saito Ho-on Kai Museum Research Bulletin*, 査読無, 77, 2013, 1-8.

Takano N, Takahashi Y, Yamamoto M, Teranishi M, Yamaguchi H, Sakamoto AN, Hase Y, Fujisawa H, Wu J, Matsumoto T, Toki S, Hidema J. Isolation of a novel UVB-tolerant rice mutant obtained by exposure to carbon-ion beams. *Journal of Radiation Research*, 査読有, 54, 2013, 637-648.
DOI: 10.1093/jrr/rrt007

Teranishi M, Nakamura K, Furukawa H, Hidema J. Identification of a phosphorylation site in cyclobutane pyrimidine dimer photolyase of rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 査読有, 63, 2013, 24-29.
DOI: 10.1016/j.plaphy.2012.11.003.

Hitomi K, Arvai AS, Yamamoto J, Hitomi C, Teranishi M, Hirouchi T, Yamamoto K, Iwai S, Tainer JA, Hidema J, Getzoff ED. Eukaryotic Class II CPD photolyase structure reveals a basis for improved UV-tolerance in plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 査読有, 287, 2012, 12060-12069.
DOI: 10.1074/jbc.M111.244020.

〔学会発表〕(計8件)

寺西 美佳、イネにおける太陽紫外線誘発ピリミジン二量体の定量と生育に及ぼす

影響、日本宇宙生物科学会第29回大会、2015年9月26日、帝京大学板橋キャンパス(東京都・板橋区)

Teranishi M. Analysis of DNA damage induced by ion beam, gamma ray and UV-B radiation in *Arabidopsis*. 15th International Congress of Radiation Research, 2015年5月25日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

Hidema J. Effects of solar UVB radiation on rice plant and mechanisms of UVB resistance in plant. 15th International Congress of Radiation Research, 2015年5月25日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

寺西 美佳、基部陸上植物ゼニゴケの太陽放射線応答に関する研究、日本宇宙生物科学会第28回大会、2014年9月22日、大阪府立大学中百舌鳥キャンパス(大阪府・堺市)

寺西 美佳、シロイヌナズナにおけるイオンビーム誘発損傷の定量解析、第9回高崎量子応用研究シンポジウム、2014年10月9日、高崎シティーギャラリー(群馬県・高崎市)

寺西 美佳、植物における放射線誘発DNA損傷の定量解析、日本宇宙生物科学会第27回大会、2013年9月27日、筑波大学(茨城県・つくば市)

寺西 美佳、イネの紫外線抵抗性とピリミジン二量体の生成数に関する解析、日本放射線影響学会第55回大会、2012年9月6日、東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)

寺西 美佳、植物を用いた太陽放射線誘発DNA損傷修復のリアルタイム観察系の検討、日本宇宙生物科学会第26回大会、2012年9月27日、徳島大学(徳島県・徳島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺西 美佳 (TERANISHI, Mika)
東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号: 10333832

(2) 研究分担者

日出間 純 (HIDEMA, Jun)
東北大学・大学院生命科学研究科・准教授
研究者番号: 20250855